

平成 18～19 年度研究成果の概要

各年度の 研究成果目標	各年度の研究成果（成果の活用状況を含む）
<u>1. 遺伝的感受性要因</u> 低用量の化学物質曝露により引き起こされる神経系、免疫系、及びその相互作用における有害性を評価するモデル作成のため、嗅覚閾値の検出、免疫過敏、神経過敏にかかわるサイトカイン、転写因子、記憶関連遺伝子などの情報伝達遺伝子の発現について検討する。 主に、平成 18 年度は C3H/HeN,BALB/c, 2 系統のマウスで、平成 19 年度は C57BL/10,B10.BR マウスを用いた研究を実施。	1. 18 年度は、ヒトの生活環境中で身近に存在し、健康に悪影響を及ぼしうると考えられる VOC に関して、その嗅覚検知閾値をマウスにおいて求めるため、その実験計測系を作製した。一般的なオペラント箱に、におい嗅ぎ用鼻先挿入ポート、および 2 種類のガスをポートに送り込むためのハードウェア（電磁バルブ、流量計、エアポンプ）を増設し、それらを一括制御するためのプログラムを作成した。マウスでトルエンを用いて調べた結果、ヒトでは数百 ppb と報告されているトルエンの検知閾値が、C3H マウスにおいては 5 ppb 以下であることがわかった。19 年度は、BALB/c と C57BL 系統のマウスでトルエンを用いて調べた結果、いずれの系統においても、5 p p b のトルエン・ガスの正答率が 80 % 以上に達した。すなわち、系統に関わりなく、マウスのトルエンに対する嗅覚検知閾値は 5 p p b 以下であることがわかった。 2. 免疫過敏モデル作成のため、18 年度雄 C3H/HeN,BALB/c,C57BL/10,B10..BR マウスを用いて低濃度トルエンの 6 週間曝露を行ったところ、抗原感作したマウスでは免疫担当細胞分画及び Th2 サイトカインである IL-4、IL-5、IL-13 の蛋白産生が C3H/HeN,BALB/c 系統で認められたが、トルエンによる有意な修飾作用は認められなかった。一方、抗原感作がない状態では、C3H マウスにおいてトルエン曝露による Th2 へシフトする傾向が観察された。抗原投与マウスにおける脾臓で Th1/Th2 サイトカイン産生にかかわる転写因子遺伝（GATA3, T-bet, FoxP3）の発現を比較すると、C3H/HeN マウスでいずれも発現の亢進がみられた。一方、19 年度 C57BL/10,B10..BR マウスではいずれも変化がみられていない。IL-2 の産生及び T 細胞の活性化を示唆する転写因子 STAT5 の活性化をゲルシフト法により調べると、いずれの系統でも活性化が観察された。低濃度トルエン曝露は種々の指標に影響を及ぼす事が示唆された。またゲルシフト法の結果からトルエンは細胞レベルで作用する事が示され、このことから、STAT5 などの細胞内分子をトルエン曝露に対するバイオマーカーとして用いる事ができる可能性が示唆された。 3. 18 年度は、低濃度化学物質曝露による神経過敏状態、および免疫系刺激との併用による神経—免疫相互作用における海馬での記憶関連および炎症関連遺伝子発現について雄 C3H/HeN,BALB/c, 2 系統のマウスで比較検討した。その結果、低濃度トルエン曝露では CREB1mRNA の発現増強が両系統で認められた。免疫刺激と低濃度トルエンを曝露した C3H マウス海馬においてはグルタミン酸受容体 NR1mRNA, ドーパミン受容体 D1, D2mRNA や CREBmRNA、及び TNFα の遺伝子発現は有意に増強した。BALB/c マウスでは、免疫刺激と低濃度トルエンの曝露で CaMKIVmRNA の抑制、及びカプサイシン受容体遺伝子発現の増加がみられるなど、2 系統におけるトルエン及び抗原刺激に対するシナプスを介する反応に明らかな違いのあることが検証できた。

2. 時間的感受性要因 胎児、小児等感受性の時間的変動の程度を把握し、発達段階に応じた影響解明のため、1. 脳形成、2. 免疫、感染、3. 内分泌、4. 行動、5. 循環に関する検討を行う。	19年度は C57BL/10,B10.BR マウスを用いた実験を行い4系統のマウス海馬および匂い情報の入り口である嗅球における記憶関連、神経成長関連遺伝子の発現への影響について比較検討した。また、神経—免疫クロストークのかく乱の可能性を明らかにするため、化学物質による海馬での神経炎症におけるリンパ球の役割についても検討した。その結果、低濃度トルエン曝露は、C57BL/10,B10.BR マウスの海馬では記憶関連遺伝子にほとんど変動はみられず、免疫刺激が加わってもトルエン曝露と対照群との間に差はみられなかった。次に、18, 19年度の嗅球における記憶関連遺伝子の発現では、低濃度トルエン曝露で C3H マウスのグルタミン酸受容体 NR2A,NR2BmRNA 発現の抑制が認められ、抗原刺激との併用で NR1mRNA も抑制された。BALB/c マウスでは抗原刺激とトルエン曝露により NR2A,NR2BmRNA のみならず D1,D2 ドーパミン受容体遺伝子発現の抑制がみられた。C57BL/10 マウスにおける NR2AmRNA の発現抑制と B10.BR マウスでの D1mRNA 発現の亢進がみられた。図2に示すように4系統におけるトルエン及び抗原刺激に対する反応に明らかな違いのあることが検証できた。これらの結果は、低濃度、長期のトルエン曝露が嗅球や海馬において記憶形成機構に過敏な状態を生じたことを示唆しており、抗原刺激による免疫系の活性化も神経—免疫クロストークを通じてそこに関与していることが推測され、免疫した C3H/HeN マウスを用いた VOC 曝露モデルは神経、免疫の過敏状態を評価する新たな実験モデルとして有用と考えられる。 1. 18年度は、発達期の脳形成における性分化に重要な働きをもつ性ステロイドホルモンに対する低濃度トルエン曝露の影響を検証するため、胎生後期にトルエンを曝露した胎仔ラットの血中テストステロンおよび脳内エストラジオールを測定した。その結果、正常では雄胎仔の性ステロイドレベルは雌胎仔よりも高いが、トルエン曝露によって雄胎仔の血中テストステロン (図3: 2-1) および脳内エストラジオールレベルは低下した。雌胎仔のホルモンレベルへの影響はみられなかった。トルエン (9あるいは 90 ppm) によって低下した雄胎仔の脳内エストラジオールレベルは雌のレベルと同程度になり、性差が消失した。さらに、雄胎仔の脳内アロマターゼタンパク質発現量はトルエン (90 ppm) によって有意に低下しており、アロマターゼ発現の低下がエストラジールレベルの低下の一因であることが示唆された。トルエン曝露が性ステロイド作用に依存した雄ラットの脳の性分化に影響を及ぼすと考えられたことから、19年度では、性分化において性ステロイドが脳に作用する臨界期である周生期でのトルエン曝露 (50 ppm) による新生仔の脳の構造形成およびその性差に関与する脳内アポトーシスへの影響を検証した。その結果、成熟期に構造的差がみとめられる SDN-POA と呼ばれる脳領域において、新生仔期のアポトーシスがトルエン曝露によって促進し、死滅細胞が増加することが明らかになった。また、新生雌ラットでは、SDN-POA の周囲領域におけるアポトーシスもトルエン曝露によって促進し、細胞死に対する広範囲な影響があることも分かった。以上のことから、発達期のトルエン曝露が脳形成に影響を及ぼし、その影響と作用機序が性別によって異なることが考えられた。不可逆的な発達期のアポトーシス細胞死への影響は成熟期まで持続することから、成熟期において性別によって異なる脳機能への影響として顕われる可能性がある。
---	---

2. 18年度は、発達期の免疫、感染モデルを作成するための予備実験として、グラム陽性菌細胞壁成分ペプチドグリカン (PGN) による経気道刺激が Th1 機能の発達またはアレルギー反応の抑制へと導くか否かを明らかにするために、離乳直後 (3週齢) の BALB/c マウスに PGN $4\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ を3日おきに計5回点鼻投与した後、卵白アルブミン (OVA) をアジュバントである水酸化アルミニウムゲルと共に2週間おきに計4回腹腔内投与し、トール様受容体 TLR2・TLR4 の遺伝子発現レベルなどへの PGN 刺激の効果について解析した。その結果、離乳直後からの PGN 経気道刺激は、Th1 機能発達やアレルギー抑制へと導かなかった。細菌毒素の感作時期、感作濃度の詳細な検討の必要性が示唆された。19年度は、胎児、小児等の時間的変動による化学物質曝露に対する感受性の差異を Th1/Th2 バランスの発達や感染抵抗性を指標に定量的に明らかにすることを目的とし、胎児期のみ、および胎仔期から乳仔期にかけてのトルエンのみの吸入曝露を行って Th1/Th2 バランスの形成を調べた。胎児期のみのトルエン曝露は Th1 および Th2 の両方の反応を高める傾向を示した。胎児期から乳児期にかけてのトルエン曝露は、Th1 反応を抑えて Th2 反応を高める傾向を示した (図3:2-2)。また、トルエン曝露と BCG との併用は、トルエンのみの曝露によって高まった Th2 反応の抑制傾向を示した。このことから、免疫系発達期において Th2 反応の抑制を引き起こす細菌として BCG が有用である可能性が示唆された。免疫系への影響はトルエン曝露の時期 (免疫系の発達時期)、および細菌刺激によって異なることが示唆された。

3. 活性型ビタミン D (1,25-dihydroxyvitamin D₃)はビタミン D 受容体 (VDR) のリガンドとして多くの遺伝子の発現を制御している。18年度は、授乳期 TCDD)曝露が腎臓遠位尿管細胞に障害を起こすことに着目して、ダイオキシン類のビタミン D 代謝や Ca の再吸収・輸送に及ぼす影響を検討した。その結果、出産後1日目母獣マウスに TCDD を経口投与して、母乳を介して TCDD 曝露した仔マウスにおいて、TCDD が活性ビタミン D 合成と分解に関与する酵素の遺伝子発現を顕著に誘導することが分かった。また TCDD により血清中活性型ビタミン D 濃度も上昇した。TCDD は Ca の細胞内の輸送と排出に関与している Calbindin および NCX-1 遺伝子発現を生後7日目に抑制した (図3:2-3)。さらに生後5週齢マウスで Ca およびリンの尿中排泄増加が認められた。以上の結果から TCDD がビタミン D 代謝および Ca 代謝の異常を惹起する結果、骨毒性をもたらす可能性が示唆された。19年度は TCDD による骨形成への影響およびその毒性発現メカニズムについて検討を行った。その結果、小腸においては Ca 吸収関連遺伝子の発現を TCDD は促進した。骨形態計測結果から、TCDD による脛骨の骨密度、骨塩量の減少が認められた。骨代謝の代表的マーカーである血中オステオカルシン濃度の低下、および骨中オステオカルシン mRNA 発現を TCDD は有意に低下させた。TCDD の骨毒性は類骨の増加と骨の石灰化の阻害による骨形成障害によることが明らかとなった。本研究により、授乳期低用量 TCDD 曝露は、腎臓におけるビタミン D 代謝および Ca²⁺輸送の攪乱作用をもたらすことが明らかとなった。

	4. これまでに新生期のラット脳がビスフェノールAに曝露すると、運動を司るドーパミン神経の発達障害をきたし、多動性障害をおこすことを明らかにしている。18年度は、こうした新生期の曝露の影響が、成熟期にも残存しているどうかを調べた。明らかなカテコールアミン合成酵素（ドーパミン神経の指標）の免疫交叉性が消失していた。更に、ドーパミン神経変性疾患であるパーキンソン病の病理像の1つであるアルファ・シヌクレインの凝集像も観察された。次に、1成熟期のドーパミン神経が、ビスフェノールAの曝露影響を受けるか否かを微量注入法により検討した。その結果、ビスフェノールAを微量注入した左黒質側の投射先である線条体のカテコールアミン合成酵素の免疫交叉性が消失し、退行性変性が観察された。このことは、ビスフェノールAは成熟ドーパミン神経に影響を及ぼし、パーキンソン病等の神経変性疾患の原因になりうる可能性を示している。19年度は神経系毒性を有する化学物質としてのロテノンにより新生児曝露を行い、学童期及び成熟期での影響評価を行動を主な指標として行った。本研究ではロテノンによるパーキンソン病のモデルラットの作製を試みた。その結果、ロテノンの新生児ラット行動への影響を自発運動量をエンドポイントとして調べると、それは投与用量、投与回数によって異なることが判明した。また、本研究で作製したロテノン曝露による成熟パーキンソニズムラットは、固縮、無動、平衡障害、歩行障害を示した（図3：2－4）。その自発運動量を定量すると対照ラットのそれと比較すると約49%の寡動を示した。以上の結果から、本研究で用いたウイスター系ラットではロテノンに対して新生期から成熟期までその感受性を有していることが示された。また、同一化学物質が曝露時期により全く異なるラット行動特性が規定されていることが明らかになった。 5. 19年度は、環境化学物質の血管新生・形成過程に及ぼす影響の評価のため、妊娠正常動物にサリドマイドとペルメトリンを投与し、胎仔の血管に及ぼす影響を血管の距離や分岐数で調べた。その結果、ペルメトリンは胎仔の脳底血管の形成異常を引き起こした（図3：2－5）。正常妊娠動物への単回投与実験では、慢性毒性試験NOAEL(4.8mg/kg/day)より低い用量(2mg/kg)で、血管の分岐数に変化がみられた。化学物質が血管の発達に及ぼす影響という観点から、化学物質の安全性を評価した研究はほとんど見あたらないのが現状である。血管が発生し形成する時期での暴露により阻害影響が検出する系が確立できた。妊娠時期における農薬の暴露量に注意をする必要があることを示唆するデータが得られた。 3. 複合的感受性要因 化学物質曝露に脆弱な集団の高感受性要因解明のため、in vivo アトピー性皮膚炎モデルでの検証、及びアレルギー増悪影響の <i>In vivo</i> スクリーニングモデル(アトピー性皮膚炎様病態を発症するマウスモデル：NC/NgaTndCrlj(NC/Nga)を用い環境化学物質のアレルギー増悪影響を検討した。18年度の対象物質は、フタル酸ジイソノニル(DINP)、アジピン酸ジイソノニル(DINA)、トリメリット酸トリス(2-エチルヘキシル)(TOTM)、フタル酸モノエチルヘキシル(MEHP)、ビスフェノールA(BPA)、ペルフルオロオクタン酸(PFOA)、ペルフルオロオクタンスルホン酸(PFOS)、塩化トリブチルスズ(TBT)とした。その結果、DINP、BPAにおいて、対照群、あるいはダニアレルゲン(Dp) 単独投与群に比し、化学物質の濃度、あるいは病態の形成段階によって有意な皮膚炎症状の増悪、および耳介腫脹を認めた。MEHPは濃度によって増悪傾向を示した。一方、PFOAは、投与濃度によってDp
--	---

より簡易なスクリーニング手法の開発を行う。	単独群に比し、有意な耳介腫脹の抑制を認めた。 19年度は、さらに他の対象化学物質についても検討した。その結果、ベンゾ[a]ピレン、ナフトキノン、フェナントラキノン、スチレンモノマー処置群において、対照群、および Dp 単独投与群に比し、化学物質の濃度、あるいは病態の進行段階によって有意な耳介腫脹の変化を認めた。また、症状変化も同様の傾向を示した。4-ノニルフェノール、フタル酸ジブチルについては、増悪傾向を示した。一方、アクリルアミドは、Dp 単独群に比し、有意な耳介腫脹の抑制を認めた。細胞培養系を用いた簡易スクリーニング手法の開発では、免疫担当細胞を用いて、in vivo の結果を反映するより簡易な in vitro スクリーニング手法について検討した。DINP、BPA はいずれも、脾細胞の TCR の発現および IL-4 産生を濃度依存的に増加させた。また、これらの化学物質は抗原刺激による細胞増殖も増強させた。この作用は、BPA は 0.1 μM 以下、DINP は 1 μM 以下といずれも低濃度域で観察された。今回の結果で特に、IL-4 産生と細胞増殖に対する影響が顕著であったことから、in vitro スクリーニングの指標として有用である可能性が示唆された。
------------------------------	--